

# Etude de la croissance de quelques souches de levures sur les sous-produits du raffinage de l'huile d'arachide

## Essais de valorisation des pâtes de neutralisation

A. BA (1), R. RATOMAHENINA (1), J. GRAILLE (2) et P. GALZY (1)

**Résumé.** — Le raffinage alcalin des huiles d'arachide est générateur d'un sous-produit important, les pâtes de neutralisation (P.N.). Les P.N. sont d'autant plus abondantes que l'acidité initiale de l'huile brute est élevée. On peut estimer en moyenne à 5 p. 100 la masse des P.N. par rapport à l'huile brute, mais ce chiffre peut être supérieur. Pour les pays en voie de développement, il est intéressant de valoriser ces P.N. en les convertissant en protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.). Les auteurs qui pensent ainsi contribuer à promouvoir de nouvelles sources d'aliments riches en protéines, ont étudié la croissance de quelques souches de levures sur ce substrat, source de carbone. Ils ont établi en particulier les vitesses de croissance, les rendements de croissance en matière sèche et en protéines. Ils ont de plus étudié l'influence du pH et de la température sur les différents systèmes biologiques. La composition en acides aminés des différentes levures cultivées a été déterminée et une étude particulière des acides gras des résidus a été conduite pour déceler une sélectivité éventuelle liée à la longueur de chaîne et à l'insaturation.

### INTRODUCTION

Le Sénégal est le 4<sup>e</sup> producteur d'arachides du monde avec une production annuelle qui dépasse souvent 1 000 000 de tonnes dans des conditions climatiques normales. Ce pays est équipé d'huileries pour traiter toute sa production. Parmi les sous-produits du raffinage de l'huile brute d'arachide, les pâtes de neutralisation représentent un tonnage important (2 à 5 p. 100 de l'huile brute traitée). Ces pâtes de neutralisation, ou soapstock, sont destinées quasi entièrement à l'industrie des acides gras précurseurs de détergents, de bases pour les peintures, de plastifiants etc. Le raffineur qui brade ce sous-produit a donc intérêt à valoriser ce dernier de la façon la plus rentable afin de compenser la perte au raffinage. D'autre part, en ce qui concerne les pays en voie de développement, qui raffinent des tonnages de plus en plus importants, il est souhaitable que cette valorisation contribue directement à la promotion de nouvelles sources d'aliments aussi bien pour l'homme que pour les animaux. Une des possibilités de valorisation de ces pâtes de neutralisation pourrait être leur utilisation comme substrat de croissance de microorganismes, en particulier de levures, en vue de la production de protéines alimentaires.

La production de levures aliments sur matières grasses a fait l'objet de nombreux travaux, notamment ceux de Vuillemin *et al.* [1979], qui ont étudié la dégradation des acides gras de C<sub>4</sub> à C<sub>18</sub> par *Candida lipolytica*, Hottinger *et al.* [1974], qui ont montré la possibilité pour *Candida lipolytica* et *Geotrichum candidum* de croître sur huile de pois-

son et enfin de Szechenyi *et al.* [1976] qui ont signalé qu'il était possible de produire des levures sur matières grasses d'origine végétale (huiles de colza, tournesol...) ou d'origine animale (moelle osseuse, saindoux, suif de bœuf...) en utilisant des souches appartenant à l'espèce *Kluyveromyces fragilis*.

Notre étude a consisté à sélectionner des souches de levures à forte activité lipasique par la détermination de leurs paramètres de croissance, afin d'évaluer leurs aptitudes à produire des protéines d'organismes unicellulaires sur huile acide provenant des pâtes de neutralisation, sous-produit du raffinage d'huiles brutes d'arachide.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### A. — Matériel biologique.

Les souches étudiées ici proviennent, pour la plupart, du Centraal Bureau voor Schimmelcultuur (C.B.S.), Yeast Division, de Delft (Pays-Bas). Ces souches sont : *Candida curvata* CBS 570, *Candida deformans* CBS 2071, *Candida humicola* CBS 2822, *Candida parapsilosis* CBS 604, *Candida rugosa* CBS 613, *Candida tropicalis* CBS 5696, *Candida tropicalis* CBS 6320, *Candida utilis* CBS 5609, *Candida zeylanoides* CBS 619, *Cryptococcus laurentii* CBS 139, *Cryptococcus uniguttulatus* CBS 1730, *Kluyveromyces fragilis* CBS 397, *Kluyveromyces lactis* CBS 2359, *Kluyveromyces lactis* CBS 6315, *Rhodotorula rubra* CBS 17, *Rhodotorula sitimaneae* CBS 5804, *Saccharomycopsis lipolytica* CBS 6317, *Torulopsis ingeniosa* CBS 4240 et *Trichosporum berkeleyi* CBS 2466.

La souche de *Lipomyces starkeyi* LS1 a été isolée au laboratoire de la chaire de génétique et de microbiologie de l'E.N.S.A.

Deux souches proviennent de la Northern Utilization Research and Development Division, U.S. Department of Agriculture, Peoria (Illinois). Ce sont : *Candida lipolytica* NRRL YB 423-3 et *Candida lipolytica* NRRL YB 423-12.

(1) I.N.R.A.-E.N.S.A., Chaire de génétique et de microbiologie, 9, place Viala, 34060 Montpellier Cedex (France).

(2) Département Chimie des Corps gras GERDAT-I.R.H.O., B.P. 5035 - 34032 Montpellier Cedex (France).

## B. — Techniques de culture.

### Milieux de culture.

Les études ont été réalisées sur les milieux suivants :

— YE-glucose, composé d'extrait de levure Difco (0,5 p. 100) et de glucose (0,5 p. 100) ;

— YNB-huile acide, composé de Yeast Nitrogen Base Difco (0,67 p. 100) et d'huile acide à des concentrations variables. Ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 110 °C pendant 30 min, à l'exception du YNB, qui l'est par filtration sur filtre Millipore (0,45 µm), et ajouté avant ensemencement.

### Conditions de culture.

Toutes les cultures sont effectuées en milieu liquide dans des erlenmeyers remplis au 1/10 de leur volume et agités pour assurer une aération convenable (80 oscillations par min, amplitude 7,5 cm) et thermostatés à 28 °C.

## C. — Etude de la croissance.

La détermination des paramètres de croissance des souches ne peut être réalisée directement sans élimination au préalable des fines gouttelettes d'huile présentes dans le milieu de culture et résultant de l'émulsion provoquée par l'huile acide en milieu aqueux. L'élimination de la matière grasse se fait par filtration des suspensions microbiennes, suivie de lavages à l'aide d'éthanol et d'hexane. Deux techniques sont utilisées suivant l'importance du volume cellulaire à traiter.

### 1) Filtration de faibles volumes de suspensions cellulaires.

Un faible volume (1 à 2 ml) de suspension cellulaire est prélevé stérilement et transféré dans un bécher propre ; 4 ml d'éthanol sont ajoutés à la suspension. Celle-ci est filtrée à l'aide d'un filtre « Swinnex Millipore » muni d'une membrane (0,45 µm) qui retient les cellules. L'alcool éthylique élimine l'eau adsorbée sur la membrane ainsi qu'une partie des corps gras contenus dans la suspension cellulaire. Ensuite on fait passer 4 ml d'hexane à travers la membrane pour éliminer les dernières traces d'huile acide et de l'air pour sécher la pastille de levures. La membrane est prélevée à l'aide d'une pince, puis trempée dans une cuve cylindrique contenant un volume connu d'eau distillée. L'ensemble est soumis à un traitement aux ultra-sons pendant 15 à 20 s en vue de faciliter la mise en suspension des cellules. La suspension cellulaire ainsi obtenue, débarrassée de toute trace de matière grasse, est transférée dans un tube de photodensitomètre (Néphélomètre de Klett).

### 2) Filtration de volumes importants de suspensions cellulaires.

100 ml de suspension cellulaire sont mélangés à 40 ml d'éthanol à 95-96°, puis filtrés sous vide sur membrane Millipore (Millex 0,45 µm). Les levures retenues par la membrane sont lavées avec 40 ml d'hexane pour éliminer les corps gras suivant la technique décrite précédemment.

La courbe de croissance est établie par mesure, en fonction du temps, de la densité optique de la culture à l'aide d'un colorimètre « Klett-Summerson » muni d'un filtre

sélectionnant une gamme de longueurs d'onde variant de 400 à 450 nm.

La matière sèche est déterminée par pesée, jusqu'à poids constant, après dessiccation à 108 °C, d'une solution aqueuse de cellules lavées préalablement. La technique de lavage varie selon la nature du substrat utilisé.

Le dosage des protéines est effectué selon la réaction du biuret [Strickland, 1951]. La mesure est faite à l'aide d'un colorimètre Klett-Summerson muni d'un filtre sélectionnant une gamme de longueurs d'onde variant de 520 à 580 nm.

Le dosage des acides aminés est effectué sur les lyophilisats des levures.

Les chaînes peptidiques des protéines sont hydrolysées en milieu chlorhydrique 6 N sous atmosphère d'azote pour éviter l'oxydation de la méthionine en méthionine sulfone ou sulfoxyde. L'hydrolyse est réalisée dans une étuve thermostatuée à 110 °C pendant 24 heures.

L'hydrolysate qui présente des matières en suspension est filtré et évaporé sous pression réduite à basse température (dans un bain-marie à 35° maximum). Le résidu est repris par une solution tampon citrate pH 2,2 de volume adéquat. 20 µl de cette solution sont injectés dans un appareil Durrum D 500, afin de déterminer les acides aminés par chromatographie à haute pression, en phase liquide, sur résines échangeuses d'ions. L'élution des acides aminés s'effectue selon un gradient de tampon (tampon citrate de sodium) :

— 1<sup>er</sup> tampon pH 3,25 : séparation de l'acide aspartique, de la thréonine, de la sérine, de l'acide glutamique, de la proline, de l'alanine et de la valine ;

— 2<sup>e</sup> tampon pH 4,25 : on élue la méthionine, l'isoleucine, la leucine, la tyrosine et la phénylalanine ;

— 3<sup>e</sup> tampon pH 7,96 : sortie de l'histidine, de la lysine et de l'arginine.

Le dosage colorimétrique est effectué à deux longueurs d'onde : 440 nm pour la proline et 570 nm pour les acides aminés restants, après réaction colorée avec la ninhydrine.

## D. — Obtention de l'huile acide à partir des pâtes de neutralisation.

Rappelons que dans l'industrie, les huiles brutes d'arachide sont traitées par un excès de base forte (NaOH) en vue de l'élimination des acides gras libres. Ce traitement constitue une étape importante du raffinage. Les savons ainsi formés et séparés de l'huile par centrifugation sont appelés pâtes de neutralisation. Celles-ci sont traitées dans des réacteurs en acier par chauffage pendant 2 à 4 h en présence d'un excès d'acide sulfurique. La phase grasse qui surnage est récupérée et lavée ; elle constitue l'huile acide qui renferme 85 à 90 p. 100 d'acides gras libres et 10 à 15 p. 100 de glycérides. La phase sous-jacente contenant la majeure partie de l'acide et les boues est réutilisée après élimination de ces dernières pour acidifier le lot suivant de pâtes à traiter. L'huile acide ainsi obtenue alimente une industrie se situant en aval, l'industrie des acides gras. Les acides gras sont obtenus par distillation après saponification complète de l'huile acide.

Dans le cadre de cette étude, nous avons préparé nous-mêmes l'huile acide à partir de pâtes de neutralisation d'origine industrielle, par chauffage pendant 2 h aux environs de 100 °C en présence d'acide sulfurique en quantité suffisante pour que le pH soit maintenu très acide (< 1).

## E. — Dosage des acides gras.

## 1) Extraction des corps gras résiduels.

Lorsque la phase stationnaire de croissance est atteinte, les cultures sont filtrées sur membrane Millipore (0,45 µm), sous vide et lavées à l'aide d'éthanol, puis d'hexane. La matière organique contenue dans le filtrat ainsi obtenu est extraite 3 fois par 100 ml d'hexane dans une ampoule à décanter. Les extraits sont lavés à neutralité à l'aide d'eau distillée, séchés sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, puis récupérés dans un ballon sec de poids connu, après filtration à travers de la laine de verre chargée de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. L'hexane est évaporé et le résidu, séché sous courant d'azote jusqu'à poids constant, puis pesé.

## 2) Préparation des esters méthyliques et dosages.

Pour éviter l'interférence d'éventuels métabolites présents dans le milieu de culture, le résidu obtenu de l'extraction précédente est transformé en esters méthyliques par traitement au reflux, dans un bain-marie, à l'aide de méthylate de sodium (1 p. 100 de sodium métal dans un mélange méthanol-benzène 70-30), puis de méthanol chlorhydrique (100 ml de chlorure d'acétyle dans 1 250 ml de méthanol). Les esters méthyliques du corps gras résiduel, extraits (3 fois) par 100 ml d'hexane dans une ampoule à décanter, sont séchés sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre puis récupérés par filtration à travers de la laine de verre chargée de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Après élimination du solvant, et séchage jusqu'à poids constant, ils sont pesés.

L'acide heptadécanoïque servant d'étalon interne est également transformé en ester méthylique par traitement au reflux, à l'aide de méthanol chlorhydrique. On prépare une solution à 0,25 p. 100 (P/V) dans de l'hexane ; celle-ci est ajoutée aux esters méthyliques du corps gras résiduel de telle sorte que le poids d'heptadécanoate de méthyle représente 20 p. 100 du poids des esters méthyliques du corps

gras résiduel. Après séchage sous courant d'azote, les esters méthyliques totaux sont pesés puis repris en solution à 2 p. 100 (P/V) dans de l'hexane. 1 µl de cette solution est analysé par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire en verre.

Le dosage est effectué dans les conditions suivantes : injecteur 275 °C, détecteur FID 275 °C, four 180 °C ; colonne capillaire en verre imprégnée de carbowax 20 M en statique suivant la méthode de Grob [1977] avec L = 10 m,  $\phi_1 = 0,2$  mm, épaisseur du film : 0,1 µm environ. Le gaz vecteur est l'hélium (ou de l'hydrogène suivant l'appareil) avec un débit de 2 cm<sup>3</sup>/min.

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

## A. — Etude de la vitesse de croissance.

Les courbes de croissance réalisées sur YNB (0,67 p. 100), additionné de 0,5 p. 100 d'huile acide, nous ont permis de déterminer graphiquement les temps de génération exprimés en heures et donnés dans le tableau I. Ce tableau regroupe en outre le pH initial et final des milieux de culture pour toutes les souches étudiées. Il indique que, seules, 5 souches présentent des temps de génération relativement courts, compatibles avec une utilisation industrielle. En effet, *Candida lipolytica* YB 423-12 et *Candida lipolytica* YB 423-3 ont un temps de génération de 2,5 h ; *Candida rugosa* CBS 613, *Candida tropicalis* CBS 6320 et *Saccharomycopsis lipolytica* CBS 6317 ont un temps de génération de 3 h. Pour les autres souches appartenant aux genres *Candida*, *Rhodotorula* et *Trichosporum*, les temps de génération sont importants et varient de 5 à 12 h. Les souches du genre *Cryptococcus* voient leur biomasse doubler en 15 h, alors que celles des genres *Torulopsis* et *Lipomyces* présentent en moyenne un temps de génération de 22 h. Enfin, parmi les souches du genre *Kluyveromyces*, seule l'espèce *Kluyveromyces lactis* CBS 6315 semble pré-

TABLEAU I. — Temps de génération de diverses levures cultivées sur huile acide.

Souches de levures	Densité optique finale	Temps de génération (heures)	pH initial	pH final
<i>Candida curvata</i> CBS 570	1,5	12,0	5,0	3,0
<i>Candida deformans</i> CBS 2071	2,2	7,5	6,0	3,0
<i>Candida humicola</i> CBS 2822	1,1	8,0	5,0	4,0
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-3 NRRL	2,4	2,5	5,0	3,0
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-12 NRRL	2,1	2,5	5,5	3,0
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604	1,9	7,0	6,0	3,0
<i>Candida rugosa</i> CBS 613	2,1	3,0	5,0	3,0
<i>Candida tropicalis</i> CBS 5696	1,8	5,0	5,3	2,2
<i>Candida tropicalis</i> CBS 6320	3,7	3,0	5,3	2,3
<i>Candida utilis</i> CBS 5609	2,5	8,0	5,6	2,4
<i>Candida zeylanoides</i> CBS 619	1,6	10,0	5,5	3,3
<i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139	1,4	15,0	5,0	3
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> CBS 1730	1,1	15,0	6,0	3,9
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 397	0,2	—	5,0	5,0
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2359	0,4	—	5,0	5,0
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 6315	3,2	60,0	5,0	3,0
<i>Lipomyces starkeyi</i> (collection laboratoire)	4,2	23,0	5,0	3,0
<i>Rhodotorula rubra</i> CBS 17	2,1	7,0	5,9	2,7
<i>Rhodotorula sitimanae</i> CBS 5804	2,0	10,0	6,0	2,6
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i> CBS 6317	2,8	3,0	6,0	3,0
<i>Torulopsis ingeniosa</i> CBS 4240	1,0	22,0	5,0	3,0
<i>Trichosporum bergeli</i> CBS 2466	2,0	8,0	6,0	2,6

senter une certaine aptitude à métaboliser l'huile acide mais avec un temps de génération extraordinairement long. Les deux autres souches de *Kluyveromyces* ont une croissance très faible et ne semblent pas présenter d'activité sur ce substrat contrairement à ce qui est indiqué dans la littérature.

Dans tous les cas, on enregistre une baisse du pH allant jusqu'à 2 ou 3 au cours de la croissance. A ce stade, la croissance ralentit, et s'arrête même pour certaines souches.

### B. — Etude des rendements de croissance.

Ces rendements de croissance ont été déterminés pour les 5 souches présentant un temps de génération convenable. Les résultats sont donnés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Rendements en protéines et en matière sèche et teneur en protéines des cellules cultivées sur huile acide

Souches de levures	Rendements en protéines p. 100	Rendements en matière sèche p. 100	Teneurs en protéines p.100
<i>Candida rugosa</i> CBS 613 .....	12	31	39
<i>S. lipolytica</i> CBS 6317 .....	16	55	29
<i>C. lipolytica</i> YB 423-12 .....	17	51	33
<i>C. lipolytica</i> YB 423-3 .....	17	45	38
<i>C. tropicalis</i> CBS 6320 .....	27	69	40

Ce tableau indique que les meilleurs rendements en protéines et en matière sèche sont obtenus avec *Candida tropicalis* CBS 6320 (27 p. 100 et 69 p. 100), alors que pour la souche de *Candida rugosa* CBS 613 ces rendements sont faibles (12 p. 100 et 31 p. 100). Les deux souches de *Candida lipolytica* présentent des rendements comparables. Signalons que ces rendements expriment les quantités de protéines et de matière sèche par rapport au substrat introduit dans le milieu. Pour 2 des 5 souches (*Saccharomycopsis lipolytica* CBS 6317 et *Candida lipolytica* YB 423-12), la teneur protéique des cellules est moins

bonne. Cependant, le tableau III montre que toutes les souches étudiées ici sont riches en lysine.

### C. — Etude de l'action du pH.

Les cultures sont ici effectuées sur milieux tamponnés, de pH variant de 2,5 à 9. Les tampons (tartrate-phosphate 0,2 M pour les pH acides, phosphate 0,2 M pour les pH voisins de la neutralité, et carbonate 0,2 M pour les pH alcalins) ont été utilisés pour cette étude. La figure 1 donne la valeur des taux népériens de croissance (en  $h^{-1}$ ) en fonction du pH. Nous voyons que la souche de *Candida rugosa* CBS 613 présente un léger avantage à pH 6,5-7 : le

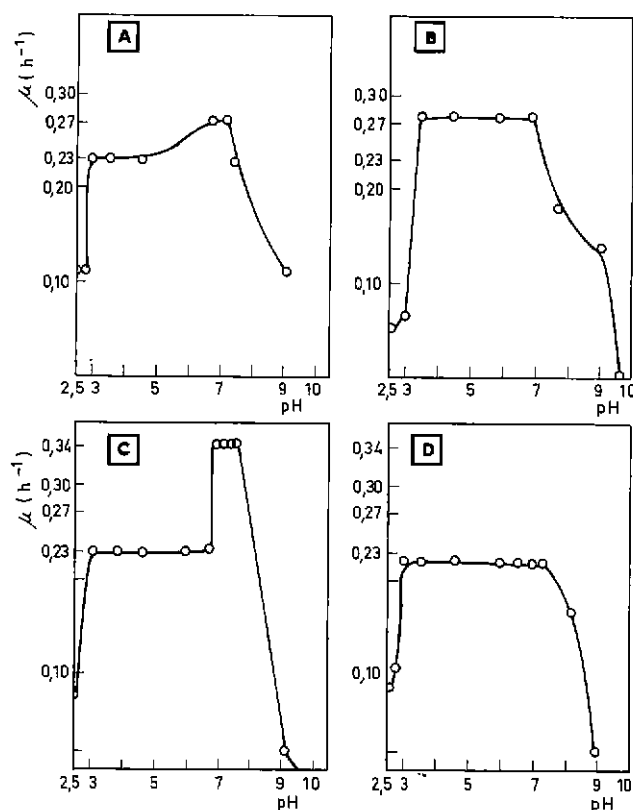


FIG. 1. — Evolution des taux népériens de croissance en fonction du pH de :

A : *Candida rugosa* CBS 613 ; B : *Candida lipolytica* YB 423-12  
C : *Saccharomycopsis lipolytica* CBS 6317 ; D : *Candida tropicalis* CBS 6320

TABLEAU III. — Composition en acides aminés des souches de levures cultivées sur YNB glucose.

Les valeurs indiquent les pourcentages des divers acides aminés (poids/poids), par rapport aux acides aminés totaux

Souches	Acides aminés	asp	thr	ser	glu	pro	gly	ala	cys	val	met	ileu	leu	tyr	phe	his	lys	arg	trp
<i>Candida rugosa</i> CBS 613		12	6	8	12	4	6	8	1	7	2	4	7	3	4	2	7	5	2
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i> CBS 6317		11	6	6	12	4	6	8	1	6	2	5	8	3	4	3	8	5	2
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-12		11	6	6	12	5	6	8	1	6	2	5	8	3	4	2	8	5	2
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-3		11	6	6	12	4	6	8	1	6	2	5	8	3	4	2	8	6	2
<i>Candida tropicalis</i> CBS 6320		12	6	5	17	3	5	7	1	5	1	4	7	3	3	3	9	7	2



taux néperien de croissance est de  $0,27 \text{ h}^{-1}$  à pH 7. Ce taux baisse sensiblement pour des pH inférieurs à 3 et supérieurs à 7. La souche de *Candida lipolytica* YB 423-12 présente un taux de croissance constant entre pH 7 et 3. Ce taux baisse rapidement pour des pH plus basiques ou plus acides. La souche de *Saccharomycopsis lipolytica* CBS 6317 présente un taux de croissance élevé à pH 7 :  $0,34 \text{ h}^{-1}$  ; pour des pH compris entre 3 et 6,5, ce taux n'est que de  $0,27 \text{ h}^{-1}$ . Enfin, la souche de *Candida tropicalis* CBS 6320 présente un taux de croissance rigoureusement constant entre pH 3 et 7,5.

#### D. — Etude de l'action de la température.

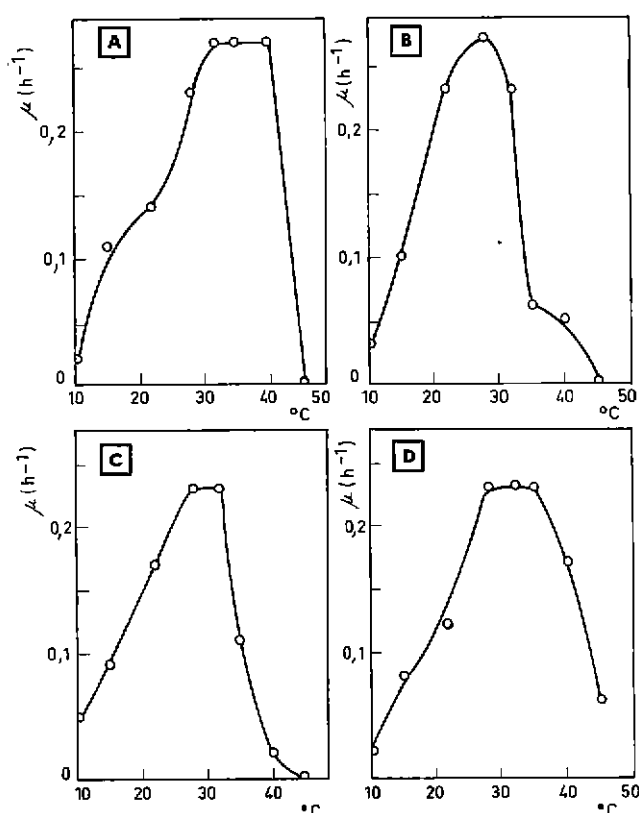


FIG. 2. — Evolution des taux néperiens de croissance en fonction de la température de :

A : *Candida rugosa* CBS 613 ; B : *Candida lipolytica* YB 423-12  
C : *Saccharomycopsis lipolytica* CB 6317 ; D : *Candida tropicalis* CBS 6320

En utilisant le milieu YNB-huile acide (0,5 p. 100) à pH non régulé, nous avons étudié l'action de la température sur la vitesse de croissance. La figure 2 indique les variations des taux néperiens de croissance en fonction de la température pour les 4 souches sélectionnées. Notons que dans ce type d'utilisation industrielle, la réaction est exergonique et la réfrigération constitue un élément important du prix de revient. Sous climat tropical, une souche comme *Candida rugosa*, qui présente une croissance optimale entre 35 °C et 40 °C, peut être intéressante.

#### E. — Etude du substrat résiduel.

##### 1) Composition de l'huile acide.

Le tableau IV rappelle la composition de l'huile acide et de ses deux fractions : « huile neutre » et « acides gras libres ». Cette composition montre la prépondérance de cinq principaux acides gras qui sont, par ordre d'import-

tance : l'acide oléique (C 18 : 1), l'acide linoléique (C 18 : 2), l'acide palmitique (C 16 : 0), l'acide stéarique (C 18 : 0) et l'acide béhénique (C 22 : 0). L'acide myristique (C 14 : 0), présent à l'état de traces, semble provenir essentiellement de la fraction neutre de l'huile acide. Il est curieux de constater que le C 14 : 0, présent dans une fraction, ne se retrouve pas dans l'huile acide. La situation inverse est observée pour le C 20 : 3. Ces acides gras sont présents à l'état de traces et leur mise en évidence précise est difficile.

TABLEAU IV. — Composition qualitative et quantitative (en pourcentage poids/poids) de l'huile acide, de la fraction « neutre » et de la fraction « acide gras libres »

Acides gras	Fraction « acides gras libres »	Fraction « neutre »	Huile acide
C 14 : 0	—	0,9	—
C 16 : 0	11,5	10,3	11,1
C 16 : 1	0,2	0,3	0,3
C 18 : 0	3,7	3,6	3,7
C 18 : 1	60,9	57,5	60,6
C 18 : 2	15,4	19,2	16,0
C 18 : 3	0,8	0,4	0,8
C 20 : 0	1,6	1,7	1,5
C 20 : 1	1,5	1,4	1,3
C 20 : 3	—	—	0,4
C 22 : 0	3,0	3,0	3,1
C 24 : 0	1,6	1,5	0,8
Autres	—	0,2	0,4

##### 2) Dosage du substrat résiduel.

Lorsque les cultures ont atteint la phase stationnaire de croissance, les milieux sont filtrés et la matière organique résiduelle contenue dans le filtrat est extraite selon la méthode déjà décrite. Pour les cinq souches étudiées, les résultats sont consignés dans le tableau V où les valeurs expriment en p. 100 (p/p) la consommation des divers acides gras par les souches de levures. De plus, la quantité totale d'acides gras résiduels est donnée. La teneur initiale en acides gras totaux est de 500 mg/100 ml. Le tableau donne, pour chaque souche, le résultat d'une expérience représentative prise comme un exemple.

A la concentration initiale d'huile acide de 0,5 p. 100 (p/v), le pourcentage (p/p) du substrat résiduel varie de 6 à 8 p. 100 pour les souches de *Candida lipolytica*. Ce pourcentage est de 7 p. 100 pour *Saccharomycopsis lipolytica* et de 14 p. 100 pour *Candida rugosa*. La souche de *Candida tropicalis* CBS 6320 semble mieux métaboliser le substrat car, en phase stationnaire de croissance, il ne reste plus que 1 p. 100 (p/p) du substrat initial.

Des études similaires ont montré qu'en présence de 0,4 p. 100 (p/v) de substrat initial, seule la souche de *Candida tropicalis* métabolise entièrement le substrat. Il est probable que dans la quasi-totalité des cas, la croissance s'arrête avant la disparition totale du substrat parce que le pH d'arrêt de la culture a été atteint. Il est connu en effet que le milieu YNB « difco » est peu tamponné. Nous avons vu précédemment, d'une part que la croissance ralentissait très rapidement au-dessous de pH 3 et que, d'autre part, le pH final de nos cultures était inférieur à 3 (Tabl. I). Il est probable que la totalité du substrat sera métabolisée lorsque l'on travaillera dans des conditions industrielles, avec régulation de pH.

Il nous a paru intéressant de calculer en fonction de la

TABLEAU V. — Taux de consommation des différents acides gras par diverses souches de levures

Acides gras \ Souches	<i>Candida lipolytica</i> YB 423-12	<i>Candida lipolytica</i> YB 423-3	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i> CBS 6317	<i>Candida rugosa</i> CBS 613	<i>Candida tropicalis</i> CBS 6320
C 16 : 0	92	94	93	87	99
C 16 : 1	42	68	53	100	100
C 18 : 0	84	90	90	84	98
C 18 : 1	93	95	80	86	99
C 18 : 2	93	95	94	85	98
C 18 : 3	100	100	97	98	100
C 20 : 0	70	83	93	81	98
C 20 : 1	92	94	96	91	100
C 20 : 3	100	100	100	100	100
C 22 : 0	64	81	93	88	97
C 24 : 0	60	57	100	82	94
Acides gras totaux résiduels (mg)	44	31	34	69	6

teneur du substrat résiduel, pour les concentrations initiales d'huile acide de 0,4, 0,5 et 0,6 p. 100 (p/v), les rendements qui expriment effectivement la biomasse obtenue à partir de la quantité de substrat réellement métabolisée. Ces valeurs sont légèrement supérieures à celles données dans le tableau II, où les rendements expriment la biomasse obtenue pour une quantité de substrat présente dans le milieu de culture au départ. Ces nouveaux rendements sont donnés dans le tableau VI.

Les résultats du tableau V (taux de consommation des divers acides gras par les souches) nous permettent de faire un certain nombre d'observations bien que les différences soient faibles et probablement peu significatives :

— le groupe des *lipolytica* métabolise le C 16 : 1 moins bien que le C 16 : 0 (50 p. 100 en moyenne, pour 90 p. 100). Les acides gras C 20 : 1 et C 20 : 3 semblent être mieux consommés que le C 20 : 0. Le C 18 : 3 est très bien métabolisé. En définitive, pour les trois souches, la seule spécificité serait une consommation plutôt lente de l'acide gras C 16 : 1 ;

— *Candida rugosa*, par contre, consomme le C 16 : 1 un peu plus vite que le C 16 : 0 ; les autres acides gras sont dans l'ensemble très bien consommés, à l'exception du C 20 : 0 où 80 p. 100 seulement du C 20 : 0 initial sont consommés ;

— *Candida tropicalis* consomme presque totalement tous les acides gras, ce qui explique le rendement élevé observé.

## CONCLUSION

La culture de levures sur huile acide d'arachide en vue de la production de protéines alimentaires est concevable. Nous avons le choix entre utiliser *Candida lipolytica* YB 423-12, à vitesse de croissance très rapide, ou *Candida tropicalis* CBS 6320, qui présente un rendement de croissance meilleur mais une vitesse de croissance un peu plus faible. De toute façon, seule l'optimisation en pilote pourrait permettre un choix définitif entre ces deux souches. Il n'est d'ailleurs pas impossible que l'on puisse trouver des souches encore meilleures dans l'une ou l'autre de ces deux espèces.

Une attention particulière sera portée à l'étude des températures de croissance. Il est possible, en effet, que *Candida rugosa*, CBS 613 présente un avantage particulier à cause de son taux de croissance élevé entre 35 et 40 °C (0,27 h<sup>-1</sup>). L'utilisation industrielle de ce nouveau procédé devra s'effectuer probablement dans des conditions où le pH sera régulé. Pour des raisons économiques, il est préférable de ne pas stériliser ce type de culture. Bien qu'un certain nombre de souches aient un pH optimal de croissance voisin de la neutralité, il peut être intéressant de travailler à pH 3,5 car, dans ces conditions, les contaminants bactériens sont faciles à éviter. C'est donc à ce pH qu'il conviendra de comparer les souches finalement retenues. Rappelons qu'à pH 3,5 le taux népérien de croissance est voisin de 0,23 h<sup>-1</sup> pour 3 des 4 souches sélectionnées, et est de 0,27 h<sup>-1</sup> pour *Candida lipolytica* YB 423-12.

**Remerciements.** — Nous tenons à remercier ici M. Dumas, chef du laboratoire d'analyses organiques et biochimiques du GERDAT, qui a effectué les analyses des acides aminés des différentes levures étudiées.

TABLEAU VI. — Rendements effectifs en protéines et en matière sèche de diverses souches de levures sur milieu YNB 0,67 p. 100 + différentes concentrations d'huile acide

Rendements \ Souches	<i>Candida lipolytica</i> YB 423-12	<i>Candida lipolytica</i> YB 423-3	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i> CBS 6317	<i>Candida rugosa</i> CBS 613	<i>Candida tropicalis</i> CBS 6320
Rendements en protéines - p. 100	20	21	21	12	27
Rendements en matière sèche - p. 100	60	53	65	31	72

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] VUILLEMIN N., LELUAN G., BORY J. (1979). — Contribution à l'étude de l'activité lipolytique de *Candida lipolytica*. *Ann. Pharm. françaises*, 37, p. 107-114.
- [2] HOTTINGER H. H., RICHARDSON T., AMUNDSON C. H. (1974). — Utilization of fish oil by *Candida lipolytica* and *Geotrichum candidum* : basal conditions. *J. Milk and Food Technol.*, 37, p. 463-468.
- [3] SZECHENYI E., SIMEK F., KARPATI G. (1976). — Production de levures sur matières grasses d'origines animale et végétale pour l'alimentation humaine. *Ind. alm. agric.*, 93, n° 4, p. 415-421.
- [4] STRICKLAND L. H. (1951). — The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. gen. Microbiol.*, 5, p. 698.
- [5] GROB K., GROB G., GROB K., Jr (1977). — The baryum carbonate procedure for the preparation of glass capillary columns ; further informations and developments. *Chromatographia*, 10, p. 181-187.

## SUMMARY

**Study of the growth of a few yeast strains on by-products of groundnut oil refining. Valorization trials of soapstocks.**

A. BA, R. RATOMAHENINA, J. GRAILLE and P. GALZY, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 8-9, p. 439-445.

Alcaline refining of groundnut oils produces an important by-product, the soapstocks. The higher the initial acidity of the crude oil, the more abundant the soapstocks ; their mass in relation to the crude oil can be estimated at an average 5 p. 100, but can be more. It would be worth while for the developing countries to valorize this by-product by converting it into proteins of unicellular organisms (PUO). The authors, who think that in this respect they have a contribution to make to the development of new sources of protein-rich foods, have studied the growth of a few yeast strains on this substrate, a source of carbon. In particular, they have worked out growth rates and the growth yield in dry matter and proteins. In addition, they have examined the influence of pH and temperature on the different biological systems. The amino-acid composition of the various yeasts cultured has been determined, and a specific study of the fatty acids in the residues has been conducted to discover a possible selectivity related to the length of the chain and the unsaturation.

## RESUMEN

**Estudio del crecimiento de algunas cepas de levaduras en los subproductos del refinado del aceite de maní. Ensayos de aprovechamiento de las pastas de neutralización.**

A. BA, R. RATOMAHENINA, J. GRAILLE y P. GALZY, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 8-9, p. 439-445.

El refinado alcalino de los aceites de maní da un importante subproducto, las pastas de neutralización (P.N.). Las P.N. son tanto más abundantes cuanto más alta la acidez inicial del aceite bruto. Se puede evaluar en un 5 % por término medio la masa de P.N. con relación al aceite bruto, pero este dato puede ser mayor. Para los países en vías de desarrollo es interesante aprovechar estas P.N. convirtiéndolas en proteínas de organismos unicelulares (P.O.U.). Los autores, que piensan contribuir así en promover nuevas fuentes de alimentos ricos en proteínas, estudiaron el crecimiento de algunas cepas de levaduras en este sustrato, que es fuente de carbono. En particular establecieron las velocidades de crecimiento, los rendimientos, de crecimiento de materia seca y proteínas. Además estudiaron la influencia del pH y de la temperatura en los diferentes sistemas biológicos. Se estableció la composición en ácidos aminados de las diferentes levaduras cultivadas, realizándose un estudio particular de los ácidos grasos de residuos, para descubrir una posible selectividad relacionada con la longitud de cadena y con la insaturación.

